

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI - UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU*
MESTRADO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Hesperozygis ringens (Benth.) Epling frente a *Sitophilus zeamais* Motschulsky,
Tetranychus urticae Koch e *Phytoseiulus macropilis* Banks**

Ana Caroline Giacomini

Lajeado, fevereiro de 2020

Ana Caroline Giacomini

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Hesperozygis ringens (Benth.) Epling frente a *Sitophilus zeamais* Motschulsky,
Tetranychus urticae Koch e *Phytoseiulus macropilis* Banks**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Ambiente e Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur
Coorientador: Prof. Dr. Noeli Juarez Ferla

Lajeado, fevereiro de 2020

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”.

Leon C. Megginson

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Vale do Taquari (Univates) pela infraestrutura cedida para a realização deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD) por suas contribuições.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência, amizade e vivências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur por sua amizade, dedicação e incentivo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Noeli Juarez Ferla por sua amizade, dedicação e incentivo.

Ao Laboratório de Acarologia da Univates pela “matéria-prima” cedida para este projeto.

Aos meus pais, Olmes e Teresinha, meu irmão André e a minha cunhada Neli, pelo apoio e incentivo.

A minha segunda família, Alaíde e Carina, pela convivência, amizade e incentivo.

E ao meu companheiro Luiz Gustavo Rampanelli, minha eterna gratidão pelo apoio, carinho e companheirismo que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A *Hesperozygis ringens* (Benth) Epling é uma planta aromática endêmica do Sul do Brasil descrita na literatura por conter alto teor de pulegona em sua composição química, substância esta, conhecida por possuir efeitos neurotóxicos contra insetos e ácaros. O objetivo deste estudo foi determinar a composição química e a toxicidade do OE de folhas *H. ringens* frente a herbívoros com importância agrícola. O OE foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e teve sua composição química analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os organismos testados nos ensaios foram *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Tetranychus urticae* Koch e *Phytoseiulus macropilis* Banks, onde se analisou a mortalidade, a concentração letal média (CL₅₀) e a seletividade. A extração do OE obteve rendimento de 3,01%, sendo a pulegona seu principal constituinte (81,03%). Os testes de atividade biológica foram realizados com o OE e com a pulegona a fim de determinar o componente fitoquímico responsável pela mortalidade dos organismos. A *H. ringens* demonstrou atividade inseticida contra *S. zeamais* nos períodos de 24, 36 e 48 horas, contudo sem atividade em 12 h. Houve atividade acaricida contra *T. urticae* e *P. macropilis* em todos os períodos. Na atividade acaricida contra *T. urticae*, a mortalidade mostrou-se semelhante no período de 2 h para o OE e pulegona. A análise dos ensaios demonstrou diferenças significativas entre o OE de *H. ringens* e pulegona na atividade inseticida, sendo a pulegona mais tóxica com CL₅₀ de 10,13, 6,91 e 5,75 $\mu\text{L.L}^{-1}$ nos períodos de 24, 36 e 48 h, respectivamente. O ácaro predador *P. macropilis* apresentou-se menos sensível aos efeitos do OE que quando submetido a pulegona. Nos testes de fumigação, o OE de *H. ringens* apresentou maior toxicidade no controle de *S. zeamais* e *T. urticae* devido à alta taxa de mortalidade apresentada. Os resultados também indicam a possibilidade de um controle biológico integrado ao controle botânico na atividade acaricida, utilizando OE de *H. ringens* ou pulegona sobre *P. macropilis*, um ácaro predador de *T. urticae*, devido a este apresentar-se mais sensível na maior parte dos ensaios, necessitando menor dosagem para provocar a morte do mesmo número de organismos de *P. macropilis*.

Palavras-chave: Bioma Pampa. *Hesperozygis ringens*. OE. Toxicidade. *Sitophilus zeamais*. *Tetranychus urticae*. *Phytoseiulus macropilis*.

ABSTRACT

Hesperozygis ringens (Benth) Epling is an aromatic plant endemic to the south of Brazil described in the literature because it contains a high content of pulegone in its chemical composition, a substance known to have neurotoxic effects against insects and mites. The aim of this study was to determine the chemical composition and toxicity of the OE of *H. ringens* leaves against herbivores with agricultural importance. The OE was extracted by hydrodistillation in Clevenger apparatus and its chemical composition was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (CG/EM). The organisms tested in the tests were *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Tetranychus urticae* Koch and *Phytoseiulus macropilis* Banks, where mortality, mean lethal concentration (LC₅₀) and selectivity were analyzed. OE extraction obtained a yield of 3.01%, with pulegone being its main constituent (81.03%). The biological activity tests were carried out with the OE and with the pulegone in order to determine the phytochemical component responsible for the organism's mortality. *H. ringens* demonstrated insecticidal activity against *S. zeamais* in the periods of 24, 36 and 48 hours, however without activity in 12 h. There was acaricidal activity against *T. urticae* and *P. macropilis* in all periods. In the acaricidal activity against *T. urticae*, mortality was similar in the period of 2 h for OE and pulegone. The analysis of the tests showed significant differences between the OE of *H. ringens* and pulegone in insecticidal activity, with pulegone being more toxic with LC₅₀ of 10.13, 6.91 and 5.75 $\mu\text{L.L}^{-1}$ in periods of 24, 36 and 48 h, respectively. The predatory mite *P. macropilis* was less sensitive to the effects of OE than when subjected to pulegone. In the fumigation tests, the *H. ringens* OE showed greater toxicity in the control of *S. zeamais* and *T. urticae* due to the high mortality rate presented. The results also indicate the possibility of a biological control integrated with the botanical control in the acaricidal activity, using *H. ringens* OE or pulegone on *P. macropilis*, a predator mite of *T. urticae*, due to the fact that it is more sensitive in most assays, requiring less dosage to cause the death of the same number of *P. macropilis* organisms.

Keywords: Pampa biome. *Hesperozygis ringens*. EO. Toxicity. *Sitophilus zeamais*. *Tetranychus urticae*. *Phytoseiulus macropilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas e flores da espécie vegetal <i>H. ringens</i> coletada em São Francisco de Assis/RS.....	20
Figura 2. Organismos de <i>S. zeamais</i> sobre milho (<i>Zea mays</i>).....	22
Figura 3. Imagem do ácaro <i>T. urticae</i>	25
Figura 4. Imagem do ácaro <i>P. macropilis</i>	28
Figura 5. Modelo de Clevenger modificado para extração de OE.	31
Figura 6. Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM), utilizado para avaliação dos constituintes do OE.	33
Figura 7. Criação de <i>S. zeamais</i> em laboratório.	34
Figura 8. Criação do ácaro fitófago <i>T. urticae</i> e ácaro predador <i>P. macropilis</i> em laboratório.	35
Figura 9. Câmara de fumigação de polietileno, com capacidade de 1L, utilizada para os ensaios das atividades biológicas inseticida e acaricida. No detalhe, a direita, placa de Petri contendo algodão umedecido e folha de feijão inoculada com o ácaro <i>T. urticae</i> ou <i>P. macropilis</i>	36
Figura 10. Cromatograma do OE de <i>H. ringens</i> mostrando em destaque a estrutura química da pulegona.	40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Espécies botânicas autorizadas no Brasil para o controle de pragas.17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de transformação de porcentagem para Probits.....	39
Tabela 2. Componentes químicos presentes no OE de folhas de <i>H. ringens</i> e seus respectivos percentuais.....	41
Tabela 3. Mortalidade de <i>S. zeamais</i> frente à toxicidade do OE de folhas de <i>H. ringens</i> e pulegona em diferentes concentrações e períodos.....	44
Tabela 4. Valores de CL ₅₀ do OE de folhas de <i>H. ringens</i> e pulegona frente a <i>S. zeamais</i> de acordo com períodos de exposição.....	45
Tabela 5. Mortalidade de <i>T. urticae</i> frente a toxicidade do OE de folhas de <i>H. ringens</i> e pulegona em diferentes concentrações e períodos.....	47
Tabela 6. Mortalidade de <i>P. macropilis</i> frente à toxicidade do OE de folhas de <i>H. ringens</i> e pulegona em diferentes concentrações e períodos.....	48
Tabela 7. Valores de CL ₅₀ do OE de folhas de <i>H. ringens</i> e pulegona frente a <i>T. urticae</i> e <i>P. macropilis</i> de acordo com períodos de exposição.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Objetivo GERAL.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1.	Defensivos botânicos	16
2.2.	Óleos essenciais	18
2.2.1	<i>Hesperozygis ringens</i>	19
2.3.	Herbívoros e formas de controle	21
2.3.1	<i>Sitophilus zeamais</i>	21
2.3.1.1	Formas de controle	23
2.3.2	<i>Tetranychus urticae</i>	24
2.3.2.1	Formas de controle	25
2.4.	Inimigos naturais e controle químico.....	26
2.4.1	<i>Phytoseiulus macropilis</i>	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1.	Material vegetal.....	30
3.1.1	Coleta e identificação.....	30
3.1.2	Extração.....	30
3.2.	Análise cromatográfica.....	31
3.2.1	Caracterização do OE de <i>H. ringens</i>	31
3.3.	Criação dos herbívoros	33
3.3.1	<i>Sitophilus zeamais</i>	33
3.3.2	<i>Tetranychus urticae</i> e <i>Phytoseiulus macropilis</i>	34
3.3.2.1	Semeadura de feijão	34
3.3.2.2	Criação do ácaro <i>T. urticae</i>	35
3.3.2.3	Criação de <i>P. macropilis</i>	35

3.4. Atividades biológicas	36
3.4.1 Atividade inseticida	36
3.4.2 Atividade acaricida.....	37
3.5. Cálculos e análise estatística.....	37
3.5.1 Rendimento.....	37
3.5.2 Mortalidade Corrigida.....	38
3.5.3 Concentração Letal Média (CL ₅₀).....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Análise cromatográfica e rendimento.....	40
4.2. Atividade inseticida	42
4.2.1 <i>Sitophilus zeamais</i>	42
4.2.1.1 OE de H. ringens e pulegona	42
4.3. Atividade acaricida.....	45
4.3.1 <i>Tetranychus urticae</i>	45
4.3.1.1 OE de H. ringens e pulegona	45
4.3.2 <i>Phytoseiulus macropilis</i>	47
4.3.2.1 OE de H. ringens e pulegona	47
5 CONCLUSÃO	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cm	Centímetros
Ca ²⁺	Íon cálcio
CG/EM	Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas
CL ₅₀	Concentração letal que mata 50% dos organismos
CO ₂	Gás carbônico
DS	Defensivos sintético
DBs	Defensivos botânicos
EP	Erro padrão
IC (95%)	Índice de confiança de 95%
IK	Índice de Kovats
L	Litro
LMR	Limite máximo de resíduos
MCN	Museu de Ciências Naturais
MC	Mortalidade corrigida
µL	Microlitro
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MS	Metabólitos secundários
NaSO ₄	Sulfato de sódio
NC	Nível de controle

ND	Nível de dano
OE	Óleo essencial
PARA	Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos
PB	Produto botânico
PROBIT	Análise de regressão
R^2	Coeficiente de determinação
Tecnovates	Parque Científico e Tecnológico do Vale do Taquari
Univates	Universidade do Vale do Taquari
UR	Umidade relativa do ar

1 INTRODUÇÃO

A agricultura representa uma relação fundamental entre a sociedade e o meio ambiente. Nesse sentido, a preocupação com as questões ambientais e com a dimensão da sustentabilidade têm se tornado cada vez mais relevante (ARTUZO et al., 2017). Diante deste cenário, o Brasil destaca-se por ser um dos maiores produtores do mundo e representa uma fonte de alimentos e matéria-prima importante para muitos países sendo sua alta produtividade relacionada a modernização tecnológica, ocorrida a partir da década de 1960, a qual favoreceu, entre outros fatores, a utilização de defensivos sintéticos (DS) em larga escala para controlar herbívoros e garantir a produção (BALSAN, 2006).

O controle de herbívoros no Brasil já passou por diversos estágios até chegar ao modelo atual adotado. Em meados de 1800, o controle era basicamente realizado através de medidas físicas e culturais, defensivos naturais e alguns poucos compostos inorgânicos como arsenicais e fluorados (CASIDA; QUISTAD, 1998; FARIA, 2009). Entre esses, os pesticidas botânicos destacavam-se por sua complexidade estrutural, alto potencial e seletividade e durante a primeira metade do século XX seu uso foi bastante relevante para a economia, tornando o Brasil um grande produtor e exportador de compostos como piretro e nicotina (MENEZES, 2005).

A partir da década de 1920 também se iniciaram os estudos de síntese de moléculas orgânicas, onde foram descritas estruturas como as da piretrina e veratrina. A síntese de moléculas orgânicas desencadeou um grande desenvolvimento nas indústrias químicas através da fabricação de produtos defensivos em massa, entre os quais se incluíam princípios ativos como os organoclorados, organofosforados,

carbamatos e piretróides. Em virtude disso, os métodos de controle natural e biológico foram rapidamente substituídos (CASIDA; QUISTAD, 1998; FARIA, 2009).

No entanto, sua utilização começou a ser questionada quando se constataram os danos ambientais causados pela forma inadequada e indiscriminada de aplicação, de modo que se constataram diversas anomalias ambientais e de saúde (HALFELD-VIEIRA et al., 2019). Na literatura científica é possível encontrar estudos sobre contaminação ambiental pelo uso de DS e seus resíduos, a qual contém uma quantidade considerável de dados sobre contaminação do ar, das águas e do solo, de alimentos e matrizes biológicas, dados de exposição de trabalhadores e seus efeitos sobre a saúde pública (CAMPAGNOLLA; BETTIOL, 2003).

Não menos importante, a baixa seletividade dos DS também apresentava-se como um grande risco para a sustentabilidade da agricultura devido à aceleração do surgimento de pragas resistentes no campo pois, apesar da resistência de organismos ser recorrente de um processo natural de evolução realizado pela pressão de seleção e tempo, no caso dos defensivos que são introduzidos artificialmente, este processo torna-se acelerado devido a força de seleção realizada pelo princípio ativo, fazendo com que os efeitos de sua toxicidade diminuam em um período mais curto, sendo cada vez mais difícil controlar as infestações (HOY, 1995).

Atualmente, os DS ainda encontram-se como uma parte importante do pacote tecnológico aderido pelos agricultores brasileiros, especialmente porque o clima brasileiro favorece o desenvolvimento de doenças e pragas. Devido a essa adoção, o Brasil tornou-se dependente do controle convencional para atingir níveis mais elevados de produção (DE BARROS et al., 2019). No entanto, a necessidade de uma estrutura robusta e confiável para diminuir os impactos ambientais nas atividades do agronegócio está sendo apresentada como uma tendência em países líderes na produção de alimentos (VITOUSEK et al., 2009).

Segundo dados obtidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019b), através do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), entre os anos de 2017 e 2018 foram analisadas 4616 culturas vegetais onde verificou-se que 23% das amostras apresentaram ou contaminação por

defensivos não autorizados para a cultura correspondente; ou princípios ativos permitidos em concentração acima do limite máximo de resíduos estabelecido (LMR); ou princípio ativo proibido, ou seja, princípio ativo banido ou que ainda não foi permitido para uso no Brasil, sugerindo a adaptação de organismos aos agentes de controle já existentes. Assim, uma das premissas básicas para o desenvolvimento de novos produtos defensivos é a redução da velocidade de estabelecimento de populações resistentes e a redução dos impactos ambientais e de saúde (MARTINS, 2016).

Diante desse cenário, torna-se importante o investimento em pesquisas que identifiquem novas substâncias capazes de substituir os praguicidas atuais. Entre as alternativas, encontram-se os produtos botânicos (PB). Os PB, em sua maioria, possuem algum tipo de atividade biológica que pode servir para diversas das necessidades do homem. São obtidos de qualquer parte do vegetal como de raízes, caules, folhas e frutos e a depender do tipo de extração utilizada assumem o formato físico de pós, extratos ou OE (DUKE et al., 2000). Na agricultura, muitas destas substâncias atuam como inseticidas, fungicidas, acaricidas, bactericidas, entre outros (ANVISA, 2019a).

Dos PB, os óleos essenciais (OE) encontram-se bastante promissores, pois se apresentam como substâncias secundárias do metabolismo vegetal com característica líquida, bastante odorífera, voláteis e que interagem provocando toxicidade por mais de uma via metabólica, o que dificulta o surgimento de populações resistentes (MOREIRA et al., 2006). Frente à utilização de DS, também se diferenciam por serem de uma fonte natural e renovável de controle, de rápida degradação, possuir seletividade aos inimigos naturais e baixa permanência no ambiente, os quais favorecem práticas como a de manejo integrado e também em sistemas orgânicos de plantio (CHIASSEON et al., 2004; HINCAPIÉ et al., 2008; VENZON et al., 2008; BERNARDI et al., 2010; HALFELD-VIEIRA et al., 2019).

Das espécies em potencial para o controle de herbívoros, o presente estudo abordou *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. Trata-se de uma planta aromática com ocorrência endêmica do Bioma Pampa do Rio Grande do Sul e descrita na literatura científica (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006) por apresentar toxicidade a alguns

grupamentos de artrópodes tais como ácaros e insetos causando mortalidade ou inibindo suas fases de desenvolvimento (RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2014a).

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a composição química e a toxicidade do OE de *H. ringens* frente à *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) e *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Para determinar se o componente majoritário é a substância responsável pela toxicidade do OE de *H. ringens*, utilizou-se pulegona em todos os ensaios de toxicidade. Avaliou-se também a seletividade do OE de *H. ringens*, como acaricida, frente ao ácaro *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1905) (Acari: Phytoseiidae), um inimigo natural utilizado no controle do ácaro *T. urticae*, nas mesmas condições experimentais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Defensivos botânicos

Na natureza, diversas substâncias químicas que são secretadas pelas plantas desempenham um papel de proteção contra herbívoros, inibindo o desenvolvimento, repelindo ou provocando sua morte. A origem dessas substâncias ocorre através do metabolismo secundário das plantas e apresentam uma ampla diversidade estrutural cuja biossíntese é determinada pela pré-disposição genética de cada espécie vegetal associada a outros fatores bióticos e abióticos que interferem na sua composição. Diversos processos extrativos podem ser utilizados para sua obtenção a partir da planta, resultando em apresentações na forma de extratos sólidos (pós) ou líquidos, bem como de óleos essenciais. Os metabolitos de interesse podem ser encontrados em todas as partes do vegetal ou localizado em estruturas específicas e servir de protótipo para a síntese química de desenvolvimento de novos produtos, tais como os defensivos botânicos (DB) (DUKE et al., 2000).

Os DB possuem inúmeros benefícios quando comparados aos produtos de origem sintética entre os quais vale a pena salientar quatro deles: 1) Por serem de origem natural, são produtos de fácil degradação; 2) Em grande parte, agem por mais de um mecanismo de ação dificultando o surgimento de populações resistentes; 3) São produtos que possuem poucos halogênios ligados em suas moléculas e, portanto, apresentam menor risco de impacto ambiental (DUKE et al., 2002) e 4) Milhares desses compostos são produzidos por plantas, microrganismos e animais em decorrência da coevolução dos organismos produtores e suas pragas, portanto, a

grande maioria dos compostos naturais apresentam algum tipo de atividade biológica. Assim, entende-se que é mais fácil encontrar na natureza compostos com atividade praguicida do que testar compostos de forma aleatória para a formulação de novos defensivos (GONÇALVES, 2016).

No Brasil, atualmente existem seis plantas que se encontram entre as monografias autorizadas pela ANVISA (2019a) para o controle de pragas e podem ser conferidas quanto à espécie, princípio ativo e classe agronômica como demonstrado na Quadro 1.

Quadro 1. Espécies botânicas autorizadas no Brasil para o controle de pragas.

Nome científico	Culturas	Derivado vegetal / Parte usada	Princípio ativo	Classe agronômica
<i>Azadirachta indica</i>	Abóbora, abobrinha, acelga, agrião, alface, algodão, alho, almeirão, batata, batata-doce, batata yacon, berinjela, beterraba, brócolis, café, cará, cebola, chalota, chicória, chuchu, citros, coco, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, crisântemo, ervilha, feijão, feijão-caupi, feijão-vagem, fumo, gengibre, inhame, jiló, mamão, mandioca, mandioquinha-salsa, melancia, melão, milho, morango, nabo, pepino, pimenta, pimentão, rabanete, repolho, rúcula, soja, tomate e uva.	Óleo vegetal ativo (puro) / Sementes	Azadiractina ¹ A Azadiractina B	Inseticida
<i>Citrus sinensis</i>	Agrião, alface, brócolis, chicória, couve chinesa, couve-de-bruxelas, couve folha, couve-flor, espinafre, repolho e rúcula.	Óleo essencial / Casca da fruta	D-limoneno	Inseticida e fungicida
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Abacate, abóbora, abobrinha, alface, alho, arroz, aveia, banana, batata, batata-doce, berinjela, brócolis, café, caju, caqui, cebola, centeio, cevada, chuchu, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, feijão, figo, goiaba, mamão, manga, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêssego, pimenta, pimentão, quiabo, repolho, tomate, trigo, triticale e uva.	Óleo essencial / Folhas	α -Terpineno Terpinen-4-ol Y-Terpineno	Fungicida e bactericida
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Alface, batata, cenoura, citros, feijão, mamão, melancia, melão, pimentão, tomate e uva.	Extrato etanólico / Raízes e aproximadamente 1 a 5 cm do caule	Emodina Emodina-1-O- β -D-Glucosídeo Resveratrol Parietina Resveratrol-3-O- β -D-glucosídeo	Fungicida
<i>Sophora flavescens</i>	Algodão, café, citros e soja	Extrato etanólico / Semente	Oximatrina	Acaricida
<i>Tephrosia cândida</i>	Não identificado	Isca granulada / Não identificado	Flavonas saponínicas do tipo rotenóides	Formicida

Fonte: ANVISA (2019a).

Diante desse cenário, é possível perceber que o mercado de DB ainda encontra-se significativamente baixo frente à disponibilidade dos produtos sintéticos, podendo-se atribuir algumas desvantagens frente a sua utilização e comercialização, são elas: 1) Baixa persistência no ambiente: muitos DB são rapidamente degradados, e assim, apresentam baixa persistência, o que pode exigir aplicações mais frequentes, elevando os custos de produção; 2) Necessidade de sinergistas: a rápida degradação ou a metabolização de enzimas desintoxicantes dos insetos-alvo pode somente atordoar temporariamente, não causa morte de insetos ou outras pragas. Assim, deve ser adicionado sinergistas aos DB para inibir certas enzimas desintoxicantes, aumentando a ação do produto; 3) Carência de pesquisas: os resultados científicos sobre eficiência e toxicidade crônica aos mamíferos não estão disponíveis para muitos inseticidas botânicos e a tolerância de resíduos tóxicos em alimentos também não tem sido estabelecida; 4) Registro: o principal entrave à chegada dos inseticidas botânicos ao mercado é o registro, pois, em geral, se trata de um complexo de substâncias com estruturas moleculares diferentes, de maneira que as instituições de registro em todos os países solicitam a identificação de todas essas substâncias e seus correspondentes testes toxicológicos (MENEZES, 2005).

No entanto, observa-se uma crescente demanda pela utilização de recursos mais sustentáveis e seguros em todo mundo tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente e práticas agrícolas de base ecológica, estão recebendo maior atenção e novos incentivos à pesquisa com vistas à diminuição do uso de defensivos convencionais. Pode-se dizer assim que, nos últimos anos, o interesse por moléculas naturais tem atraído a atenção da comunidade científica e de algumas empresas de insumos, contribuindo com a formação de novos pesquisadores nessa área (HALFELD-VIEIRA et al., 2019).

2.2 Óleos essenciais

Os OE fazem parte de um grupo de PB os quais se caracterizam por serem constituídos por substâncias com características voláteis como mono e sesquiterpenos, ou fenilpropanóides, geralmente líquidos e que frequentemente

apresentam odor agradável e marcante. São obtidos de qualquer parte do vegetal através de técnicas de arraste à vapor d'água, hidrodestilação, expressão de pericarpo de frutos cítricos ou extração por gás carbônico (CO₂) supercrítico, este último muito utilizado na indústria (GONI et al., 2017).

Na agricultura, os OE são utilizados como acaricidas, fungicidas, herbicidas e inseticidas. Para Halfeld-Vieira et al. (2019), as plantas aromáticas e seus óleos essenciais são excelentes praguicidas, pois estes constituem-se a fração ativa dos extratos vegetais. Das atividades biológicas, a repelência mostra-se como o modo de ação mais comum. No entanto, os óleos essenciais podem agir causando mortalidade, deformações nos diferentes estágios de desenvolvimento e deterência.

Das vantagens, o sinergismo entre seus compostos, a seletividade e a rápida degradação encontram-se entre as principais. Se comparados ao uso de DS, os OE possuem um complexo de substâncias químicas que podem provocar toxicidade por mais de uma via de ação. Por esse motivo, entende-se que as chances de desenvolvimento de pragas resistentes sejam menores do que aos defensivos convencionais. Já a seletividade permite a utilização de inimigos naturais, contribuindo para um controle mais eficiente. Além do mais, com vistas a sustentabilidade, a maioria dos compostos presentes nos OE possuem como característica a rápida degradação e por isso acabam por permanecer menos tempo no ambiente, diminuindo o acúmulo de resíduos nos alimentos, água e solo (MOREIRA et al., 2006) além de contribuir com a fitossanidade dos sistemas de plantio, tornando-os menos fragilizados e menos suscetíveis a doenças (ISMANN, 2000; SOARES et al., 2011; LIMA et al., 2013).

2.2.1 *Hesperozygis ringens*

Existem diversas espécies botânicas capazes de controlar pragas. Entre elas podem-se citar as pertencentes à família Lamiaceae. Estima-se que esta família abrange cerca de 300 gêneros e, aproximadamente, 7.500 espécies distribuídas por todo o mundo, ocorrendo no Brasil em mais de 28 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005; PEREIRA, 2016). Dentre os principais metabólitos de interesse agrícola, desta família, pode-se citar o eugenol, timol, carvacol, linalol,

1,8 cineol, mentol, mentona, carvona e pulegona, associados às atividades biológicas inseticidas, antimicrobianas e acaricidas (VON POSER et al., 1996; LIMA et al., 2013).

A *H. ringes* (Figura 1), conhecida popularmente como espanta-pulga, é uma das espécies desta família descrita na literatura científica com potencial para o controle de artrópodes devido à alta porcentagem de pulegona presente em sua composição química. Trata-se de uma espécie arbustiva, lenhosa e densa, medindo cerca de 20 a 50 cm de altura com caule bastante ramificado e tecidos vegetais capazes de suportar ambientes extremos. Nativa do Brasil, possui ocorrência endêmica no estado do Rio Grande do Sul nas regiões Serra do Sudeste e Missões (FRACARO; ECHEVERRIGARAY, 2006; PINHEIRO et al., 2018). Atualmente encontra-se na lista de espécies em perigo de extinção, devido ao seu habitat ser de uma região acometida por atividades agropastoris que acabam por influenciar diretamente na sua dispersão, reduzindo o fluxo de genes e provocando o aumento da endogamia, o que consequentemente afeta sua capacidade competitiva de adaptação (FRACARO, 2006; PINHEIRO et al., 2016).

Figura 1. Folhas e flores da espécie vegetal *H. ringens* coletada em São Francisco de Assis/RS.



Fonte: Da autora.

Frente a sua composição química, a grande maioria dos estudos apresentou o monoterpeno pulegona como seu componente majoritário (RIBEIRO et al., 2010; BANDEIRA et al., 2017; ROSA et al., 2019). De forma geral, os monoterpenos são conhecidos por causar toxicidade nas funções bioquímicas e fisiológicas de insetos herbívoros (REGNAULT-ROGER, 1997), sendo sua toxicidade não necessariamente associada somente à mortalidade, mas também a outras atividades biológicas como deterrência, antibiose e repelência (LIMA et al., 2013). No caso da pulegona, a literatura científica elucida sua toxicidade ligada a vários mecanismos de ação como a hepatotoxicidade, à supressão dos canais de cálcio (Ca^{2+}) e neurotoxicidade. (MOORTHY et al., 1989; TONG; COATS, 2010; MAJIKINA et al., 2018). Frente a neurotoxicidade, Abdelgaleil et al. (2019) avaliaram os efeitos de pulegona frente a enzima acetilcolinesterase (AChE) e também frente ao neurotransmissor ácido gamma-aminobutírico (GABA) onde verificou-se a inibição de ambos, determinando algumas das formas as quais este componente pode atuar sobre o sistema nervoso dos artrópodes.

2.3 Herbívoros e formas de controle

2.3.1 *Sitophilus zeamais*

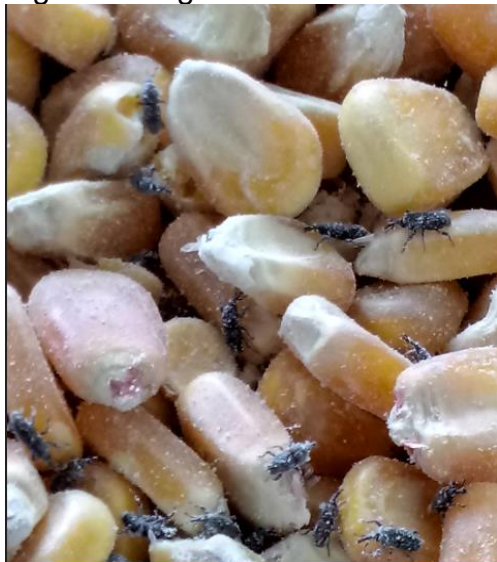
Dentre principais insetos conhecidos por provocarem danos em grãos armazenados pode-se citar *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae), conhecido popularmente como gorgulho-do-milho. Trata-se de uma espécie cuja importância agrícola está associada ao tipo de infestação, do tipo cruzada, o qual provoca danos que vão desde o campo até a armazenagem dos alimentos (GALLO, 2002).

Os organismos de *S. zeamais* são encontrados em todas as regiões quentes e tropicais do mundo, principalmente em culturas como de arroz, sorgo, trigo e milho, com preferência marcante para desovar em milho, e depois trigo, arroz e sorgo, respectivamente (ATHIE; DALMO, 2002). Também existem relatos de sua presença

em frutíferas, como em macieiras, pessegueiros e videiras (BOTTON et al., 2005), sendo que, nestes casos, a possibilidade de infestação é inferior que nas culturas anteriormente citadas devido a postura dos ovos ocorre em grãos, preferencialmente com alto teor de umidade, onde também é o local de desenvolvimento de suas larvas e pupas (MOUND, 1989; BOOTH et al., 1990; AFONSO et al., 2005).

A identificação de *S. zeamais* ocorre através das suas características morfológicas. Na fase adulta, este organismo chega a medir cerca de 2,3 a 4,5 mm, sendo os machos reconhecidos por apresentarem o rosto mais curto, fosco e largo e as fêmeas rosto mais longo, afilado e brilhante. Possuem coloração castanho-escuro, com manchas claras avermelhadas em cada élitro (asas anteriores) as quais são bem visíveis logo após a emergência dos grãos. As principais características são a cabeça projetada para frente, com rosto recurvado e élitros densamente marcados com pontuações arredondadas no dorso e uniformemente distribuídas (ATHIE; DALMO, 2002).

Figura 2. Organismos de *S. zeamais* sobre milho (*Zea mays*).



Fonte: Da autora.

Os danos causados por *S. zeamais* ocorrem devido consumo da massa no interior dos grãos que podem ser inteiramente destruídos (MATIOLI et al., 1988; SANTOS et al., 1990) ocasionando perdas do tipo qualitativo como a de valor nutritivo e diminuição do poder germinativo das sementes; e do tipo quantitativo como a redução da massa dos grãos e redução do valor comercial (LORINI et al., 2015;

GONI et al., 2017). Quanto ao potencial de infestação, segundo Athie & Dalmo (2002), em temperaturas a 28 °C e umidade relativa do ar (UR) de 60%, em milho, a ovoposição por fêmea chega a 283 ovos durante seu ciclo de vida de 104 dias, sendo o tempo de transição, de ovo a adulto, de 34 dias com uma proporção de 48% de machos e 52% de fêmeas, em média.

2.3.1.1 Formas de controle

De forma geral, o controle de *S. zeamais* é realizado, através do uso de DS, principalmente de agentes fumigantes como a fosfina. No entanto, estes podem provocar efeitos indesejáveis como a intoxicação dos aplicadores, presença de resíduos tóxicos nos grãos e resistência (PIMENTEL et al., 2009; DE ARAÚJO, 2014). Segundo De Oliveira (2017) a seleção de populações resistentes de *S. zeamais* tem sido relatada a diversos grupamentos químicos como organofosforados, piretróides e piretrinas, oxadiazinas e aos fosfetos.

No Brasil, não existem registros de inimigos naturais para seu controle, mas alguns parasitoides como *Theocolax elegans*, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* já foram elucidados pela literatura científica como patogênicos a *S. zeamais*. Entretanto, frente ao controle convencional, o uso de inimigos naturais não apresenta bons resultados, pois, os defensivos convencionais como malation, deltametrina, cipermetrina, permetrina, clorpirifós metílico e pirimifós metílico apresentam alta toxicidade a alguns desses parasitoides (DE OLIVEIRA et al., 2002).

A literatura científica também já relatou alguns PB como sendo eficientes no controle de *S. zeamais*, tais como *Azadirachta indica* A. Juss (DE COITINHO et al., 2006), *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng (KAMANULA et al., 2017), *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling (ARENA, 2017); *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betcher) Cheel (LIAO et al., 2016) e *Mentha pulegium* (poejo) (BARROS et al., 2015), sendo destes, somente *A. indica* comercializada no Brasil como inseticida natural para a cultura do milho (ANVISA, 2019a). A terra diatomácea também é um agente eficaz no controle de *S. zeamais*. Entretanto, esta somente é utilizada em locais de armazenagem, sendo o campo um local ainda suscetível aos seus ataques (ATHIE; DALMO, 2002).

2.3.2 *Tetranychus urticae*

O ácaro *T. urticae* (Figura 3), conhecido popularmente como ácaro rajado, é um dos herbívoros que mais provocam danos às culturas vegetais sendo considerado o terceiro no ranking das principais pragas de interesse agrícola no Brasil. Este fitófago é relatado por atacar mais de 1.200 espécies de plantas em todo o mundo que estão distribuídas em cerca de 70 gêneros, sendo que dessas, mais de 150 possuem importância econômica. No Brasil, as principais culturas afetadas são o morangueiro, mamoeiro, pessegueiro, algodoeiro, feijoeiro, tomateiro e plantas ornamentais como crisântemo, rosa, gérbera, orquídeas (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

O interesse agrícola encontra-se no seu controle devido a este apresentar um elevado potencial biótico de ciclo biológico curto, com alta taxa de reprodução o qual ocasiona grandes infestações rapidamente (MORAES; FLECHTMANN, 2008). Sua colonização é numerosa e seu ciclo de vida dura entre 5 a 21 dias, onde quanto maior a temperatura, menor é o tempo de desenvolvimento, sendo 25 °C com ausência de precipitação a melhor condição (OLIVEIRA et al., 2016).

Os sintomas de seus ataques podem ser reconhecidos devido à perfuração nas células da epiderme foliar, que ocorre através da inserção dos seus estiletes sugando o conteúdo celular e os cloroplastos que impedem a realização da fotossíntese, sobrando apenas uma pequena quantidade de material celular residual, que coagula, formando uma massa branco-amarelada em todo limbo foliar causando necrose e posterior queda das folhas. Entretanto, seus ataques não se mantêm somente nas folhas, mas também em flores e frutos, o que pode ser um grande problema para produtores de plantas ornamentais, pois neste tipo de cultivo a vistosidade da flor é essencial para a comercialização (PACHECO et al., 2016).

Figura 3. Imagem do ácaro *T. urticae*.



Fonte: Laboratório de Acarologia da Univates (2019).

A infestação por *T. urticae* ocorre principalmente na face inferior das folhas que as recobre com apreciável quantidade de teia que servem de locomoção para outros locais, ovoposição e proteção dos ovos contra fatores ambientais externos. Os ovos são esféricos e translúcidos de coloração clara. Quando larvas, possuem três pares de pernas e sua coloração muda gradativamente à medida que se alimentam. Na fase adulta, já com 4 pares de pernas, chegam a medir de 0,4 mm a 0,5 mm de comprimento com corpo mais esguio sendo comumente reconhecidos devido a estes apresentarem dois pontos pretos na parte dorsal do idiossoma (ZHANG, 2003).

2.3.2.1 Formas de controle

A principal forma de controle ocorre por meio da aplicação sistemática de acaricidas. Contudo, o ácaro *T. urticae* é uma das espécies que apresentam resistência a um maior número de princípios ativos diferentes, tais como: organofosforados, piretróides e piretrinas, clofentezina, diflovidazin, hexitiazoxi, diafentiurum, organoestânicos, propargito e derivados de ácido tetrônico e tetrâmico, apresentando resistência múltipla. Tal resistência pode estar relacionada ao seu ciclo biológico curto (podendo ter muitas gerações por ano), e por sua capacidade de reprodução por paternogênese onde não há recombinação gênica, o que favorece a

fixação dos genes envolvidos na evolução da resistência, pois todos os descendentes de uma progenitora resistente serão resistentes (DE OLIVEIRA, 2017).

Além do controle convencional, em países como os da Europa e em algumas partes da Ásia e África, Austrália e América do Norte, é muito comum a utilização do controle biológico com ácaros da família Phytoseiidae, tais como do gênero *Phytoseiulus* sp. e *Neuseiulus* sp. (ZHANG, 2003). No Brasil, os inimigos naturais indicados para o controle de *T. urticae* são o ácaro predador *Neoseiulus californicus* e o fungo *Hirsutella thompsonii*. No entanto, o uso de ácaros predadores encontra-se em desvantagens em sistemas de plantio convencional, devido à baixa seletividade dos produtos utilizados (ANVISA, 2019a).

Assim, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de investigar PB para o controle de *T. urticae*. Produtos à base de *A. indica*, *Aconitum carmichaeli* Debx (Wutou), *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. (Xixin), *Sophora flavescens* Ait. (Kushen), *Areca catechu* L. (Binglang), *Coptis chinensis* Franch (Huanglian), *Melia toosendan* (Kulianzi) e *Stemona japonica* (Baibu), já apresentaram bons resultados. Destes, a *S. flavescens* já se encontra em uso no Brasil como acaricida (SCHLESENER et al., 2013; ANVISA, 2019).

2.4 Inimigos naturais e controle químico

No cenário agrícola, devido às mudanças de ambiente acometidas pela ação antrópica, a presença de inimigos naturais encontra-se em desequilíbrio em relação à população de fitófagos. Isso acontece porque grandes áreas com presença de uma mesma planta (monocultura) espalham odores captados por herbívoros que delas se alimentam, facilitando seu encontro. No entanto, estes se espalham entre as plantas dificultando a busca dos inimigos naturais que muitas vezes vivem fora desse ambiente (SILVA, 2013), principalmente de predadores especialistas, pois quando não há alimento disponível, acabam por não permanecer (SILVA et al., 2005).

O uso de predadores naturais, de fato é um método de controle racional e sadio que tem como objetivo final a diminuição de populações pragas sem deixar resíduos em alimentos, sendo estes inofensivos ao meio ambiente e à saúde da população. Entre os exemplos comercializáveis no Brasil pode-se citar *Neuseiulus californicus*, *P. macropilis* e *Hirsutella thompsonii* no controle do ácaro *T. urticae*; *Cotesia flavipes* e *Trichogramma galloi* no controle de *Diatraea saccharalis* (Broca-da-cana) e *Trichogramma pretiosum* no controle de *Tuta absoluta* (Traça-do-tomateiro) (ANVISA, 2019a).

Todavia, práticas agrícolas extremamente agressivas, como uso de defensivos, trazem a tendência de anular os processos da natureza tornando os sistemas mais fragilizados (SILVA, 2013). Diante desse cenário, o controle biológico geralmente encontra-se associado a culturas de plantio alternativo ou em sistemas onde há rotatividade de controle. Isso porque, na agricultura convencional, existe uma série de agentes químicos utilizados que não apresentam seletividade provocando a morte dos inimigos naturais (GONÇALVES, 2016).

Nos casos onde há rotatividade de controle, para a utilização de inimigos naturais, torna-se necessário o monitoramento da população praga para tomada de decisões. Isso porque quando a infestação de herbívoros se encontra em estágios avançados, a utilização do controle biológico nem sempre é capaz de diminuir as perdas da produção. Nesse sentido, é necessário avaliar o nível de dano (ND), ou seja, a densidade populacional de uma praga capaz de causar prejuízo de valor igual ao do seu custo de controle; e o nível de controle (NC), que corresponde a densidade populacional de uma praga em que devem ser tomadas as decisões de controle para que a produção não tenha prejuízo. Desse modo, o uso do controle biológico, somente é recomendado para casos onde a população praga esteja abaixo do NC devido ao tempo que este levará para formar uma densidade populacional suficiente para controlar a presa, sendo sugerido o controle químico ou alternativo para casos em que este nível esteja acima do recomendável (PICANÇO et al., 2010).

2.4.1 *Phytoseiulus macropilis*

O ácaro *P. macropilis* (Figura 4) é um dos principais predadores especialistas no controle do ácaro *T. urticae*, apresentando-se com elevada voracidade e capacidade de busca de presas a campo (BERNARDI et al., 2010). Caracteriza-se por apresentar corpo de coloração avermelhada, podendo este mudar de cor em função da coloração do alimento (presa). Possui alta taxa de ovoposição em temperaturas mais quentes, com período médio de desenvolvimento nas temperaturas de 18 °C e 30 °C, de 11,6 dias e 3,8 dias respectivamente (SILVA et al, 2005).

Figura 4. Imagem do ácaro *P. macropilis*.



Fonte: Laboratório de Acarologia da Univates (2019).

Alguns estudos demonstraram o potencial de *P. macropilis* no controle do ácaro *T. urticae* quando avaliaram um alto nível de predação, chegando a consumir, aproximadamente quarenta ovos de *T. urticae* dia, além do consumo de outros estágios do seu desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2007; BERNARDI et al., 2010). Diante desse cenário, o ácaro *P. macropilis* pode apresentar boas perspectivas para o uso no controle biológico aplicado, em especial sobre condições de cultivo protegido e estufa, que são atividades em expansão no Brasil, sobretudo para floricultura e hidroponia de hortaliças e que oferecem excelentes condições para o desenvolvimento de ácaros fitófagos (SILVA et al., 2005).

No entanto, em locais onde há utilização de DS, seu uso encontra-se restrito devido à sensibilidade deste ácaro predador a produtos como neonitícoides e outros

sulfitos de alquila-fenoxiciclohexil, pirazol, avermectina, piretroide, e cetoenol que afetam severamente o desenvolvimento de sua população bem como o consumo de presas (POLETTI et al., 2007; VERONEZ et al., 2012). Nesse sentido, o uso de produtos naturais pode apresentar vantagens frente ao controle convencional quando utilizados em sistemas integrados de controle, devido a algumas espécies vegetais apresentarem-se mais compatíveis com inimigos naturais, tais como a *Agave angustifolia* e *Azadirachta indica* (VERONEZ et al., 2012).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

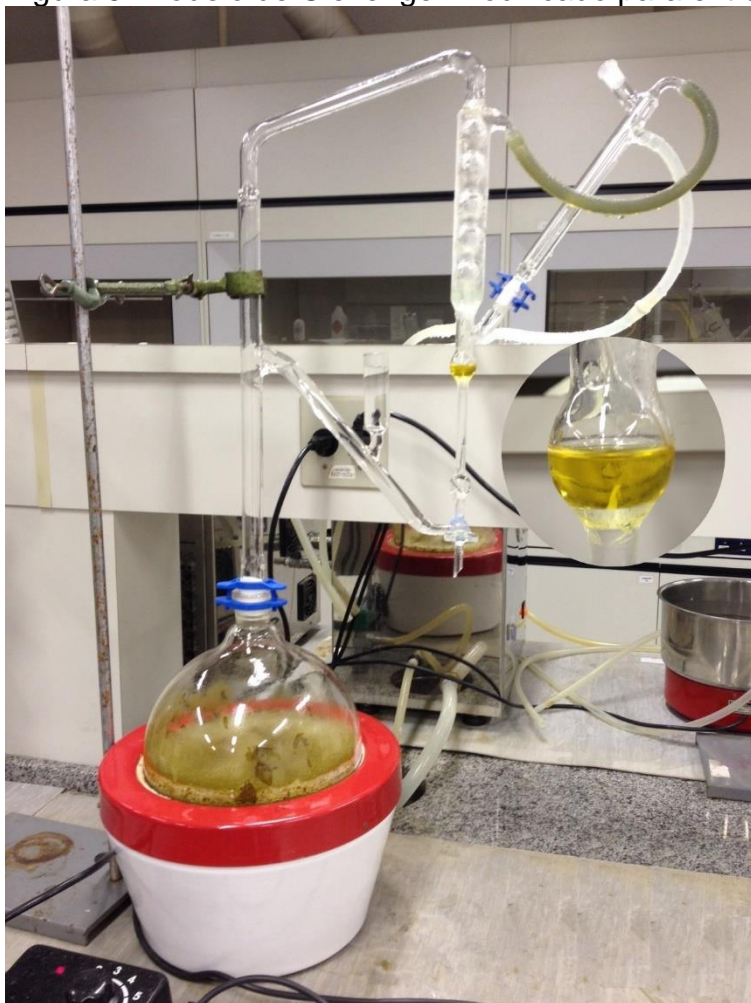
3.1.1 Coleta e identificação

As folhas de *H. ringens* foram coletadas no município de São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul, Brasil (lat.: -29.615278°; long.: -55.161111 WGS84), em dezembro de 2016 e posteriormente identificadas pela Prof. Dra. Elisete Maria de Freitas. Um exemplar foi depositado no Herbário do Vale do Taquari, localizado no Museu de Ciências Naturais (MCN) da Universidade do Vale do Taquari - Univates com o número de registro HVAT4089.

3.1.2 Extração

Para a extração do OE foi utilizada a técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (Figura 5) para a extração do OE (FARMACOPÉIA, 2017), contendo cerca de 200 g de folhas de *H. ringens*. Após o período de 2 horas, o óleo foi retirado por gravidade e removeu-se a água residual utilizando sulfato de sódio anidro. O OE foi acondicionado em frasco âmbar, sob refrigeração de -6 °C até a realização dos ensaios.

Figura 5. Modelo de Clevenger modificado para extração de OE.



Fonte: Da autora.

3.2 Análise cromatográfica

3.2.1 Caracterização do OE de *H. ringens*

A análise foi realizada na Central Instrumental do Parque Científico e Tecnológico do Vale do Taquari (Tecnovates) onde alíquotas de 1,5 μL do OE de folhas de *H. ringens* foram solubilizadas em 1,5 mL de *n*-hexano bidestilado e em um cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC2010 Plus) acoplado a um detector de massas do mesmo fabricante (modelo GCEM-QP2110 Ultra) (Figura 6), operado a 70 eV, em coluna capilar de sílica fundida Rtx[®]-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), utilizando hélio como gás de arraste. As injeções das amostras foram da ordem de

1 µL, utilizando auto injetor AOC-5000 Plus (Shimadzu). Para a análise foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor: 240 °C; modo de injeção: razão de split 1:20 com purga de 3 mL.min⁻¹; controle de fluxo de gás: velocidade linear; fluxo de gás de arraste: 1,00 mL.min⁻¹; programa: 50 °C - 290 °C (4 °C.min⁻¹); temperatura da interface do espectrômetro de massas: 280 °C, temperatura da fonte de íons: 260 °C.

Para o cálculo de índice de retenção de Kovats (IK), utilizou-se uma mistura de padrões de alcanos não ramificados (C8 a C30). Essa amostra foi diluída em *n*-hexano e analisada em comparação com os tempos de retenção dos óleos essenciais. Os índices de retenção dos compostos são obtidos de acordo com a equação que segue (VAN DEN DOLL; KRATZ, 1963).

$$Iri = 100a(b - a) \frac{Tri - Tra}{Trb - Tra}$$

onde:

Iri = índice de retenção de i

i = constituinte do óleo que está sendo analisado

a = número de carbonos do alcano que elui antes do i

b = número de carbonos de alcano que elui depois do i

Tri = tempo de retenção de i

Tra = tempo de retenção do alcano que elui antes do i

Trb = tempo de retenção do alcano que elui depois do i

A identificação dos componentes foi baseada na comparação do IK obtido experimentalmente, com os padrões semelhantes de IK presentes na literatura de Adams (2009).

Figura 6. Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrometria de Massas (CG/EM), utilizado para avaliação dos constituintes do OE.



Fonte: Da autora.

3.3 Criação dos herbívoros

3.3.1 *Sitophilus zeamais*

Os primeiros organismos de *S. zeamais* (Figura 7) foram obtidos através de grãos de milho contaminados e posteriormente identificados pelo Prof. Dr. Guilherme Liberato da Silva do Laboratório de Acarologia da Univates. Em seguida separaram-se os organismos do milho contaminado, os quais foram colocados-sobre grãos de milho saudáveis que foram previamente esterilizados a temperatura de -5°C . Foram utilizados frascos de polietileno vedados com tecido fino para a realização das trocas gasosas, onde se manteve a criação até obter-se o número necessário de organismos para a realização do experimento. A criação ocorreu em estufa com temperatura média de 25°C e fotofase de 12 h.

Figura 7. Criação de *S. zeamais* em laboratório.



Fonte: Da autora.

3.3.2 *Tetranychus urticae* e *Phytoseiulus macropilis*

As populações dos ácaros *T. urticae* e *P. macropilis* foram cedidas pelo Laboratório de Acarologia da Univates, sendo os parâmetros para a criação dos organismos determinados de acordo com a metodologia adaptada de Silva et al. (2014b) descrita abaixo.

3.3.2.1 Semeadura de feijão

Para a criação de *T. urticae* e *P. macropilis* foi necessária a semeadura de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em bandejas de polietileno de 45 cm x 30 cm x 8 cm, contendo 20 sementes (Figura 8). As bandejas semeadas foram colocadas em salas aclimatadas em temperatura de 25 °C com UR de 70% e fotofase de 12 h, adicionando 350 mL de água ao substrato diariamente.

Figura 8. Criação do ácaro fitófago *T. urticae* e ácaro predador *P. macropilis* em laboratório.



Fonte: Da autora.

3.3.2.2 Criação do ácaro *T. urticae*

Os organismos de *T. urticae* foram criados e identificados pelo Laboratório de Acarologia da Univates e posteriormente introduzidos em bandejas com feijão em sala climatizada a 25 °C em UR de 70% e mantidos em fotofase de 12 h até o momento da experimentação.

3.3.2.3 Criação de *P. macropilis*

Os organismos de *P. macropilis* foram criados e identificados pelo Laboratório de Acarologia e posteriormente foram introduzidos em bandejas de feijão previamente inoculadas com *T. urticae* (aproximadamente 30 ácaros fitófagos/planta) em sala climatizada a 25 °C em UR de 70% e mantidos em fotofase de 12 h até o momento da experimentação.

3.4 Atividades biológicas

As atividades biológicas realizadas ocorreram em câmaras de fumigação onde se utilizou recipientes de polietileno (Figura 9) de 1 L contendo papeis filtros (3x4 cm) impregnados com óleo essencial de *H. ringens* e pulegona, obtido comercialmente, na concentração de 97%. Os papeis filtros foram suspensos sob a tampa dos recipientes e as câmaras foram isoladas com plástico filme para melhor vedação, seguindo o modelo adaptado de Aslan et al. (2004). As condições experimentais foram pré-determinadas para cada organismo. Os ensaios ocorreram em estufa à temperatura de 25 °C com fotofase de 12 h e todos os resultados destes experimentos foram expressos em $\mu\text{L.L}^{-1}$.

Figura 9. Câmara de fumigação de polietileno, com capacidade de 1L, utilizada para os ensaios das atividades biológicas inseticida e acaricida. No detalhe, a direita, placa de Petri contendo algodão umedecido e folha de feijão inoculada com o ácaro *T. urticae* ou *P. macropilis*.



Fonte: Da autora.

3.4.1 Atividade inseticida

Para atividade com *S. zeamais*, disponibilizou-se em cada frasco 20 organismos selecionados ao acaso. Os ensaios ocorreram em triplicata cujas concentrações de 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 12 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ foram previamente

determinadas para o OE de *H. ringens*. As concentrações de pulegona foram aplicadas em dose proporcional a percentagem presente no OE de *H. ringens* sendo 3,35 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 6,71 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 10,06 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 13,72 $\mu\text{L.L}^{-1}$, respectivamente. Para o controle, não se utilizaram papéis-filtro. Os ensaios ocorreram nos períodos de 12; 24; 36 e 48 horas e as avaliações foram feitas ao final de cada período considerando mortos os insetos incapazes de se mover.

3.4.2 Atividade acaricida

Para a atividade acaricida com *T. urticae*, em cada frasco de plietileno de 1 L foram colocadas placas de Petri com algodão úmido, para não ocorrer a fuga dos ácaros durante os ensaios de fumigação, e folhas de feijão contendo 20 organismos selecionados ao acaso. Os ensaios com *P. Macrophilis* ocorreram de forma similar, no entanto para este utilizaram-se 10 organismos.

Ambos os organismos foram submetidos às mesmas concentrações de 2 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 6 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$ para o OE de *H. ringens* sendo as dosagens de pulegona aplicadas de forma proporcional a percentagem encontrada no OE de *H. ringens*, sendo 1,67 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 3,35 $\mu\text{L.L}^{-1}$; 5,00 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 6,70 $\mu\text{L.L}^{-1}$, respectivamente. Para o controle, não se utilizaram papéis-filtro. Os ensaios ocorreram durante os períodos de 0,5; 1; 1,5 e 2 horas e as avaliações foram feitas ao final de cada período considerando mortos os organismos incapazes de se mover.

3.5 Cálculos e análise estatística

3.5.1 Rendimento

Para o cálculo de rendimento do OE, foi utilizado a relação massa de OE obtida e a massa de folhas utilizadas (100%) conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{P_{co} - P_{so}}{P_f} \cdot 100$$

Onde:

Pco = Peso do óleo essencial com o frasco

Pso = Peso do frasco sem o OE

Pf = Peso das folhas frescas

3.5.2 Mortalidade Corrigida

Utilizou-se a mortalidade corrigida nos casos de morte natural em que o controle não excedeu 10%, sendo os valores foram corrigidos utilizando a fórmula Abbott et al. (1925), conforme abaixo:

$$MC(\%) = \frac{\% Mo - \% Mt}{100 - \% Mt} \cdot 100$$

Onde:

Mc = Mortalidade corrigida

Mo = Mortalidade observada

Mt = Mortalidade na testemunha

3.5.3 Concentração Letal Média (CL₅₀)

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias corrigidas foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) calculado pelo programa PAST 3.2 (HAMMER et al., 2001). A tabela de Probits (Tabela 1) foi usada para obtenção dos valores da Concentração Letal Média (CL₅₀) e seus respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade (FINNEY, 1952).

Tabela 1. Tabela de transformação de porcentagem para Probits.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

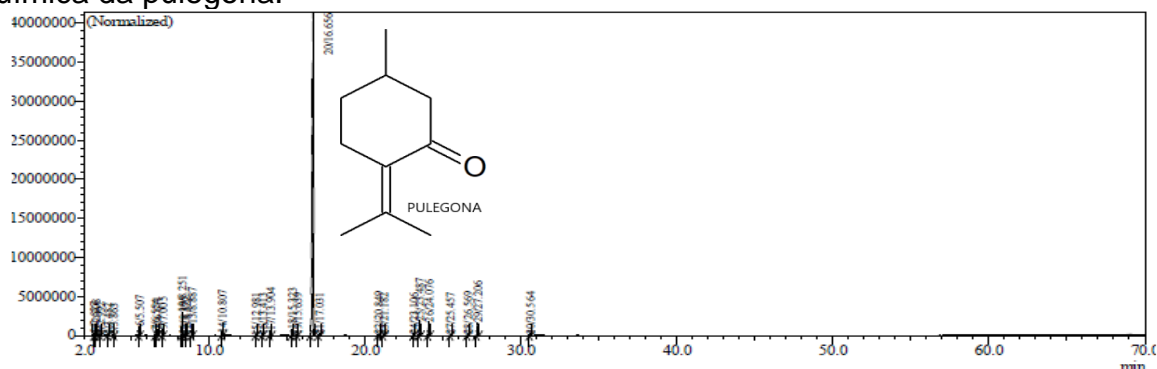
Fonte: Finney (1952).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise cromatográfica e rendimento

A Figura 10, representa o cromatograma do OE de folhas *H. ringens*, onde estão representados todos os componentes do óleo essencial. Através da análise desse cromatograma e da espectrometria de massas (Tabela 2) foi possível identificar 19 componentes constituindo 95,43% do total de compostos presentes no OE de *H. ringens* divididos em grupos de monoterpenos hidrocarbonetos (7,21%), sesquiterpenos hidrocarbonetos (4,86%), sesquiterpenos oxigenados (0,16%) e monoterpenos oxigenados (83,20%). Identificou-se a pulegona como componente majoritário, representando 81,37% do total de substâncias presentes no OE de *H. ringens*.

Figura 10. Cromatograma do OE de *H. ringens* mostrando em destaque a estrutura química da pulegona.



Fonte: Da autora.

Esta pesquisa corrobora com os estudos de Toni et al. (2014), Ribeiro et al. (2010) e Von Poser et al. (1996) onde altos níveis de pulegona foram encontrados, acima de 79%, coletados em Caçapava do Sul e São Francisco de Assis, respectivamente. Outros componentes como limoneno, (*E*)-cariofileno e biciclogermacreno foram encontrados no presente estudo em níveis acima de 2%. No entanto, em comparação com o estudo de Toni et al. (2014), o composto limoneno esteve presente em 1,28% e (*E*)- β -Ocimeno em 0,53% da composição química de *H. ringens*. No estudo de Ribeiro et al. (2010) o composto limoneno apresentou-se com 2,2% e o biciclogermacreno com 1,1%. Já no estudo de Von Poser et al. (1996) apenas o composto limoneno esteve presente em concentração de 0,2%.

Tabela 2. Componentes químicos presentes no OE de folhas de *H. ringens* e seus respectivos percentuais.

Componentes	IK ¹	IK Adams ²	Área %
α -Pino	935	939	0,88
Sabineno	975	975	0,46
β -Pino	979	979	0,78
Mirceno	992	990	0,7
Limoneno	1029	1029	2,8
1,8-Cineol	1032	1031	0,18
(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	1037	1037	0,19
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1048	1050	1,34
Linalol	1102	1096	0,46
Mentona	1155	1152	0,05
Isomentona	1166	1162	0,06
Pulegona	1244	1237	81,37
Piperitenona	1344	1343	0,24
Acetato de α -terpinila	1352	1349	0,18
(<i>E</i>)-Cariofileno	1422	1419	2,23
α -Humuleno	1456	1452	0,07
Germacreno D	1483	1481	0,27
Biciclogermacreno	1499	1500	2,25
Óxido de cariofileno	1586	1583	0,16
Total de componentes identificados			95,43
Total de monoterpenos hidrocarbonetos			7,215
Total de monoterpenos oxigenados			83,2

Total de sesquiterpenos hidrocarbonetos	4,86
Total de sesquiterpenos oxigenados	0,16

¹Índice de Kovats experimental, ²Índice de Kovats teórico (ADAMS, 2009).

Quanto ao percentual de rendimento do OE de *H. ringens*, este estudo obteve 3,01%. Estes resultados corroboram com outros estudos de *H. ringens* quando coletada em estação semelhante do ano (verão). Assim, no estudo de Pinheiro et al. (2016) o rendimento apresentou uma média de rendimento de 3,11% e no estudo de Fracaro (2006) o rendimento das plantas de *H. ringens* variaram de 0,93% para a amostra de Caçapava do Sul e 4,89% para a amostra de São Francisco de Assis.

4.2 Atividade inseticida

4.2.1 *Sitophilus zeamais*

4.2.1.1 OE de *H. ringens* e pulegona

Através do teste de fumigação, pode-se avaliar a toxicidade do OE de *H. ringens* quando utilizado para o controle de *S. zeamais*. Frente aos dados obtidos, foi possível verificar ação inseticida em diferentes níveis de toxicidade a depender do tempo de exposição e da concentração utilizada. Observou-se que quanto maior o tempo e concentração, maior a taxa de mortalidade.

Pela análise dos resultados (Tabela 3), verificou-se que em 12 h de exposição o OE de *H. ringens* não apresentou toxicidade contra os organismos de *S. zeamais* em nenhuma das concentrações testadas. No período de 24 h, as concentrações de 4 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 8 $\mu\text{L.L}^{-1}$ também não apresentaram mortalidade, no entanto, as concentrações de 12 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ causaram a morte de 11,6% e 46,6%, respectivamente. A mortalidade de 100% foi atingida na concentração de 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ no período de 36 h. O período de 48 h também obteve mortalidade de 100% em 16 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e as concentrações de 8, 12 $\mu\text{L.L}^{-1}$ não apresentaram diferenças significativas dessa concentração, demonstrando a influência do tempo de exposição na mortalidade mesmo nas concentrações mais baixas.

Não foram encontrados dados de toxicidade com *H. ringens* frente a *S. zeamais* para comparação. No entanto, a atividade inseticida foi testada por Silva et al. (2014a) frente a algumas espécies de Coenagrionidae. Os resultados apresentaram mortalidade de 73,3% dos organismos na concentração de 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$ quando expostos a um período de 4 h. Pinheiro (2014) também avaliou a toxicidade de *H. ringens*, contra as espécies de *Acanthagrion sp.*, *Homeoura sp.*, *Ischnura sp.* e *Oxyagrion sp.* As espécies utilizadas encontravam-se em estágio larval e foram submetidas aos tratamentos de 10; 50; 75 e 100 $\mu\text{L.L}^{-1}$ durante um período de exposição de 19 h. Observou-se morte de 86,6% dos organismos na maior concentração. Os estudos inferem que o óleo essencial de *H. ringens* possui efeitos tóxicos contra outras espécies de insetos, bem como possui ação tóxica sobre outros estágios de desenvolvimento.

Frente a pulegona, verificou-se que esta possui ação inseticida contra *S. zeamais* em todos os períodos testados, exceto em 12 h onde não houve mortalidade e, também, nas concentrações de 3,35 e 6,71 $\mu\text{L.L}^{-1}$ nos períodos e 24 h onde a mortalidade não mostrou diferenças significativas do controle. Esses resultados apresentaram-se similares aos obtidos com o OE de *H. ringens*. No entanto, em 24 h, as concentrações de 10,06 e 13,72 $\mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram maior nível de toxicidade, conforme demonstrado na Tabela 3. Em 36 h e 48 h, na concentração de 13,72 $\mu\text{L.L}^{-1}$ os resultados apresentaram-se semelhantes ao do OE, provocando a morte de 100% dos organismos. Alguns ensaios não apresentaram similaridades na taxa de mortalidade como no caso de 6,71 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 10,06 $\mu\text{L.L}^{-1}$ onde a pulegona apresentou-se mais tóxico. No entanto, devido a seleção casual dos organismos, o qual não levou-se em consideração fatores como a idade e sexo, diferenças no percentual de mortalidade são possíveis de acontecer.

Estudos realizados por Herrera et al. (2014), com pulegona, em ensaios de fumigação contra *S. zeamais*, apresentaram mortalidade de 100% na concentração de 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$ após 24 h de exposição apresentando CL_{50} de 11,81 $\mu\text{L.L}^{-1}$ sendo esta concentração bastante aproximada ao presente estudo que obteve CL_{50} de 10,13 $\mu\text{L.L}^{-1}$ no mesmo período, conforme mostra a Tabela 4. Outros estudos comprovando a atividade inseticida de pulegona foram encontrados. Lee et al. (2003), realizou ensaios de biofumigação contra *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus*

surinamensis, *Musca domestica* e de *Blattella germanica* apresentando mortalidade de 100% em todas as espécies quando utilizada a concentração de 50 µg.mL⁻¹ de ar durante o período de 14 h. Park et al. (2006) também testou a toxicidade de pulegona contra *Lycoriella ingenua* comprovando atividade inseticida com LC₅₀ de 1,21 µg.mL⁻¹. Os resultados desses estudos demonstram que a pulegona, assim como o OE de *H. ringens*, também possui toxicidade frente a outros grupamentos de insetos.

Tabela 3. Mortalidade de *S. zeamais* frente à toxicidade do OE de folhas de *H. ringens* e pulegona em diferentes concentrações e períodos.

Concentração (µL.L ⁻¹)	MORTALIDADE % (MC ¹ ±EP ²) ³			
	Período de exposição			
	12 h	24 h	36 h	48 h
<i>H. ringens</i>				
0	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
4	0±0 Aa	1,6±0,33 Aa	21,6±0,33 Bb	15,5±0,66 Bb
8	0±0 Aa	3,3±0,66 Aa	35±0,57 Bc	81±0,88 Cc
12	0±0 Aa	11,6±0,33 Bb	58,3±0,33 Cd	82,7±0,33 Dc
16	0±0 Aa	46,6±0,33 Bc	100±0 Ce	100±0 Cc
Pulegona				
0	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa	0±0 Aa
3,35	0±0 Aa	0±0 Aa	21,6±0,33 Bb	31±0,66 Bb
6,71	0±0 Aa	1,6±0,33 Aa	43,3±0,33 Bc	58,6±0,57 Bc
10,06	0±0 Aa	31,6±0,33 Bb	98,3±0,33 Cd	96,5±0,66 Cd
13,72	0±0 Aa	58,3±0,33 Bc	100±0 Cd	100±0 Cd

¹ MC = Mortalidade corrigida. ² EP = Erro padrão; ³ Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, para cada óleo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação a CL₅₀, não foi possível determiná-la nos períodos de 12 h e 24 h para o OE de *H. ringens*. Já nos períodos de 36 h e 48 h as concentrações médias do OE não apresentaram diferenças neste tratamento, conforme Tabela 4. No tratamento com pulegona, também não foi possível determinar a toxicidade média em 12 h. Já nos demais períodos, observou-se o aumento da toxicidade conforme o maior tempo de exposição, todos apresentando diferenças significativas. Se comparados os tratamentos, pode-se dizer que a pulegona mostrou-se mais tóxico em todos os

períodos de exposição. Devido a isso, pôde-se apontá-la como possível responsável pela mortalidade de *S. zeamais*.

Tabela 4. Valores de CL₅₀ do OE de folhas de *H. ringens* e pulegona frente a *S. zeamais* de acordo com períodos de exposição.

Período de exposição	<i>H. ringens</i>			Pulegona		
	CL ₅₀ (μL.L ⁻¹)	I.C. 95% ¹	R ² (²)	CL ₅₀ (μL.L ⁻¹)	I.C. 95%	R ²
24 h	--	--	--	10,13 a	(5,36-12,26)	0,98
36 h	9,54 Aa	(5,98 - 13,83)	0,88	6,91 Bb	(4,71-11,58)	0,81
48 h	7,54 Aa	(5,58- 13,59)	0,89	5,75 Bc	(4,37-11,45)	0,91

¹ Índice de confiança 95%; ² R quadrado. ³ Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.3 Atividade acaricida

4.3.1 *Tetranychus urticae*

4.3.1.1 OE de *H. ringens* e pulegona

Frente aos ensaios com OE de *H. ringens*, pode-se inferir que o OE de *H. ringens* possui atividade acaricida contra *T. urticae* em todos os períodos de exposição, sendo observados diferentes níveis de toxicidade a depender das condições experimentais, como demonstra a Tabela 5.

Assim na concentração de, 2 μL.L⁻¹ foi possível observar os primeiros indícios de toxicidade (5,5%) no período de 0,5 h. Nesta concentração, em 1 h; 1,5 h e 2 h os resultados não apresentaram diferenças significativas, demonstrando estabilidade no percentual de mortes. O mesmo ocorreu para a concentração de 8 μL.L⁻¹, podendo-se inferir que o melhor resultado para esta concentração encontra-se no período de 1 h, no qual a *H. ringens* provocou a morte de 85,1% dos organismos. Referente ao tempo de exposição, as concentrações, de 6 μL.L⁻¹ e 8 μL.L⁻¹, apresentaram-se semelhantes em cada período não havendo diferenças significativas entre as concentrações.

Nenhum estudo referente à toxicidade do OE de *H. ringens* frente a ácaros fitófagos fora encontrado, no entanto, a atividade acaricida já fora reportada por Ribeiro et al. (2010) que testou-o sobre o ácaro hematófago *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cuja concentrações de 50 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{L.L}^{-1}$ apresentaram inibição de 76,4% e 48,2% para a ovoposição e 95% e 30% de inibição para a taxa de eclosão dos ovos, respectivamente. Os resultados de Ribeiro et al. (2010) demonstram que o OE de *H. ringens* pode ter efeitos tóxicos sobre outros grupamentos de ácaros bem como sobre outros estágios de desenvolvimento.

Diante dos resultados (Tabela 5), determinou-se que a pulegona possui atividade acaricida contra *T. urticae*, no entanto, as concentrações de 1,67 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e 3,35 $\mu\text{L.L}^{-1}$ não apresentaram diferenças significativas do controle. Observou-se maior porcentagem de mortes quanto maior o período de exposição em todas as concentrações testadas. Em comparação com o OE de *H. ringens*, pode-se dizer que a pulegona apresentou-se menos tóxica nos períodos de 0,5 h; 1 h; e 1,5 h, sugerindo que outros componentes presentes no OE de *H. ringens* podem ter contribuído para potencializar seus efeitos entre esses períodos. Ainda assim, no período de 2 h, a pulegona apresentou taxas de mortalidade maiores em todas as concentrações se comparados ao OE de *H. ringens*, percebendo-se que esta necessitou de mais tempo para chegar ao mesmo nível de toxicidade. Não foram encontrados estudos com utilização de pulegona no controle de *T. urticae* nas mesmas condições experimentais. No entanto, Abdelgaleil et al. (2019) determinou a atividade acaricida de pulegona contra *T. urticae*, na fase adulta, apresentando CL_{50} de 3,81 mg.L^{-1} , no período de 24 h.

Em comparação a CL_{50} (Tabela 7), pode-se inferir que o ácaro *T. urticae* possui maior sensibilidade aos efeitos do OE de *H. ringens* do que de pulegona, exceto para os períodos de 1,5 h e 2 h, onde os resultados apresentam-se mais aproximados. Os resultados indicam que o tempo de exposição influenciou diretamente na mortalidade dos organismos e que a pulegona possivelmente é o componente fitoquímico responsável pela mortalidade de *T. urticae*.

Tabela 5. Mortalidade de *T. urticae* frente a toxicidade do OE de folhas de *H. ringens* e pulegona em diferentes concentrações e períodos.

Concentração ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	MORTALIDADE % ($\text{MC}^1 \pm \text{EP}^2$) ³			
	Período de exposição			
	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h
<i>H. ringens</i>				
0	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa
2	5,5 \pm 0,33Ab	53,7 \pm 0,33Bb	57,6 \pm 0,88Bb	61,4 \pm 0,33Bb
4	44,6 \pm 0,66Ac	66,6 \pm 0,57Bbc	71,1 \pm 0,33BCb	87,7 \pm 0,88Cc
6	51,7 \pm 0,57Acd	66,6 \pm 0,57Bbc	76,2 \pm 0,88BCc	89,4 \pm 1Cc
8	58,9 \pm 0,66Ad	85,1 \pm 0,88Bc	89,8 \pm 1Bc	98,2 \pm 0,33Bc
Pulegona				
0	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa
1,67	1,6 \pm 0,33Ab	3,3 \pm 0,33Bb	36,6 \pm 0,66Cb	94,7 \pm 0Db
3,35	1,6 \pm 0,33Ab	5 \pm 0,57Bc	55 \pm 0,57Cc	100 \pm 0Db
5,00	8,4 \pm 0,57Ac	18,3 \pm 0,33Bd	71,6 \pm 0,66Cd	98,2 \pm 0,33Db
6,70	16,9 \pm 0,33Ad	26,6 \pm 0,33Be	81,6 \pm 0,33Cd	100 \pm 0Db

¹ MC = Mortalidade corrigida. ² EP = Erro padrão; ³ Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, para cada óleo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2 *Phytoseiulus macropilis*

4.3.2.1 OE de *H. ringens* e pulegona

A análise dos resultados aponta que o OE de *H. ringens* possui atividade acaricida contra o ácaro *P. macropilis*. No entanto, quando comparados aos resultados obtidos com *T. urticae*, baixos níveis de toxicidade puderam ser observados. Nessas condições, pode-se dizer que o OE apresentou seletividade a este inimigo natural pois a mortalidade máxima obtida não ultrapassou os 40% (Tabela 6) na maior concentração e maior tempo de exposição, sendo que, nas mesmas condições experimentais, a mortalidade de *T. urticae* fora de 98,20% conforme demonstra a Tabela 5. Os resultados indicam a possibilidade da utilização

deste OE integrado com o ácaro predador *P. macropilis* no controle do ácaro *T. urticae* conforme demonstra a Tabela 7, havendo diferenças entre as concentrações.

Tabela 6. Mortalidade de *P. macropilis* frente à toxicidade do OE de folhas de *H. ringens* e pulegona em diferentes concentrações e períodos.

Concentração ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	MORTALIDADE % ($\text{MC}^1 \pm \text{EP}^2$) ³			
	Período de exposição			
	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h
<i>H. ringens</i>				
0	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa
2	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	3,3 \pm 0,33Bb	6,6 \pm 0,3Cb
4	3,3 \pm 0,33Bb	3,3 \pm 0,33Bb	6,6 \pm 0,33Cc	16,6 \pm 0,6Dc
6	0 \pm 0 Aa	6,6 \pm 0,33Bc	10 \pm 0Cd	23,3 \pm 0,3Dd
8	6,6 \pm 0,33Bc	6,6 \pm 0,33Bc	13,3 \pm 0,33Ce	40 \pm 0,5De
Pulegona				
0	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa
1,67	0 \pm 0 Aa	0 \pm 0 Aa	3,3 \pm 0,33Bb	10 \pm 0,57Cb
3,35	0 \pm 0 Aa	18,3 \pm 0,33Bb	36,6 \pm 0,33Cc	33,3 \pm 0,33Cc
5,00	1,6 \pm 0,33Ab	26,6 \pm 0,33Ac	41,6 \pm 0,33Bc	43,3 \pm 0,66Cd
6,70	10 \pm 0Ac	90 \pm 0,57Bd	100 \pm 0Bd	100 \pm 0Be

¹ MC = Mortalidade corrigida. ² EP = Erro padrão; ³ Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma linha e minúscula na mesma coluna, para cada óleo, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Quanto a pulegona, os resultados demonstram que esta possui atividade acaricida contra o ácaro *P. macropilis* e apresenta diferenças significativas frente ao OE de *H. ringens*, sendo o pulegona mais tóxico em todos os períodos testados (Tabela 6). Assim, a concentração de 6,70 $\mu\text{L.L}^{-1}$ apresentou alto índice de mortalidade, chegando a provocar a morte de 90% dos organismos no período de 1 h não diferenciando dos períodos de 1,5 h e 2 h, o qual apresentaram mortalidade de 100%. As concentrações menores não excederam a mortalidade de 45%. Desse modo, pode-se dizer que no caso de controle de *P. macropilis* a concentração possui maior influência do que o tempo de exposição. Os resultados da CL_{50} (Tabela 7), também sugerem que a pulegona é o componente responsável pela mortalidade de *P. macropilis*, pois enquanto as CL_{50} de pulegona foi de 5,37; 5,12; e 5,05 $\mu\text{L.L}^{-1}$ nos períodos de 1h; 1,5h; e 2 h, respectivamente, não se pôde determinar as CL_{50} do OE de *H. ringens* nessas condições experimentais, necessitando de maiores concentrações para a comparação.

Os resultados deste estudo apontam a possibilidade da utilização de pulegona no controle integrado com *P. macropilis* contra o ácaro *T. urticae*. pois os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, nas mesmas condições experimentais, os períodos de 1,5 h e 2h apresentaram CL₅₀ maiores do que o necessário para controlar o mesmo número de organismos, conforme demonstra a Tabela 7.

Tabela 7. Valores de CL₅₀ do OE de folhas de *H. ringens* e pulegona frente a *T. urticae* e *P. macropilis* de acordo com períodos de exposição.

Período de exposição	OE de <i>H. ringens</i>				Pulegona			
	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h
<i>T. urticae</i>								
CL ₅₀ (µL.L ⁻¹)	5,88	<2	<2	<2	>6,71	>6,71	2,88	<1,67
I.C. (95%)	3,18-7,16				2,2-6,64			
R ²	0,85				0,99			
<i>P. macropilis</i>								
CL ₅₀ (µL.L ⁻¹)	>8	>8	>8	>8	>6,71	5,37	5,12	5,05
I.C. (95%)					2,71-6,12 2,68-6,05 2,67-6,02			
R ²					0,91 0,93 0,96			

¹ Índice de confiança 95%; ² R² = coeficiente de determinação.

Não foram localizados estudos de pulegona frente ao ácaro *P. macropilis* para comparação. Entretanto, o estudo de Veronez et al. (2012) avaliou a toxicidade aguda e a influência de diversos compostos sobre a taxa de crescimento instantâneo dos ácaros em laboratório. Os extratos de *Allium cepa* L., *A. angustifolia*, e produtos à base de *A. indica* causaram mortalidade superior a 83% em *T. urticae*, sendo o extrato de *A. angustifolia* e *A. indica* os que apresentaram menor toxicidade frente a *P. macropilis* com mortalidade de 10% e 25% durante um período de 120 h, respectivamente. Os resultados de Veronez et al. (2012), assim como o resultado apresentado neste estudo, indicam uma possível ação integrada com o ácaro predador *P. macropilis* no controle de *T. urticae*, devido a este apresentar-se mais sensível.

5 CONCLUSÃO

O OE de *H. ringens* apresentou rendimento de 3,01%, sendo identificados 19 constituintes em sua composição química o que totalizou um percentual de 95,43% da área do OE identificada. Desses, a pulegona, pertencente ao grupo dos monoterpenos oxigenados, apresentou-se como componente majoritário compondo 81,03% do percentual OE. Componentes como limoneno, (*E*)-Cariofileno e biciclogermacreno também foram identificados em percentagens levemente acima de 2%. Já os demais componentes obtiveram percentagens bem menores, somando um total de 5,73% do total dos componentes que foram identificados, onde em média, apresentaram-se com percentagens abaixo de 1% cada.

Referente aos ensaios, o OE de *H. ringens* apresentou-se promissor para controle de *S. zeamais* e *T. urticae* devido à alta taxa de mortalidade apresentada. Os resultados obtidos apontam que seu potencial tóxico está ligado a pulegona, relatada na literatura científica por apresentar taxas de mortalidade contra diversos grupos de artrópodes, devido sua ação neurotóxica que ocorre através da inibição da AChE e também pela inibição do neurotransmissor GABA. Para *P. macropilis*, o OE de *H. ringens* não apresentou altas taxas de mortalidade se comparados ao ensaio realizado com *T. urticae*, visto que a mortalidade não ultrapassou 40%. A pulegona, quando utilizado de forma isolada, apresentou alto nível de toxicidade a *P. macropilis*, chegando a provocar a morte de 100% dos organismos na maior concentração e maior tempo de exposição. Assim, o presente estudo permite apontar a pulegona como o componente responsável por causar a morte de todos os organismos testados devido a este mostrar-se mais tóxico na maioria dos ensaios realizados.

Frente a atividade acaricida, quando comparados os efeitos de toxicidade do OE de *H. ringens* e pulegona sobre *P. macropilis*, ambos aparentam ser compatíveis de no controle do ácaro *T. urticae*, devido a este, de acordo com a CL₅₀, apresentar-se mais sensível, necessitando menor dosagem para provocar a morte do mesmo número de organismos de *P. macropilis*. Nesse caso, as substâncias testadas possivelmente poderiam favorecer a utilização deste inimigo natural em sistemas com controle integrado contra o ácaro *T. urticae* evitando elevados prejuízos que poderiam ocorrer em altas infestações. No entanto, outros ensaios são necessários para sua aplicação, como atividades biológicas *in vivo*, levando em consideração outros fatores ambientais físicos como temperatura, persistência no ambiente, disponibilidade de vento e químicos, como a interação com outros agentes controladores químicos utilizados para o controle de outros fitófagos, os quais podem interagir e interferir na sua toxicidade.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. et al. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. econ. Entomol**, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.

ABDELGALEIL, S. A. M. et al. Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2019.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2009.

AFONSO, Ana Paula Schneid et al. Controle de *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (Coleoptera: Curculionidae) com inseticidas empregados em frutíferas temperadas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 253-258, 2005.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografias autorizadas. (2019a). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: 03 jan. 2020.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório das amostras analisadas no período de 2017-2018. **Programa de análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA)**. (2019b). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9>. Acessado em 27/12/2019>. Acesso em: 03 jan. 2020.

ARENA, Julieta Soledad et al. Fumigant and repellent activities of different essential oils alone and combined against the maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). **MOJ Bioorganic & Organic Chemistry**, 2017.

ARTUZO, Felipe Dalzotto; FOGUESATTO, Cristian Rogério; DA SILVA, Leonardo Xavier. Agricultura de precisão: inovação para a produção mundial de alimentos e otimização de insumos agrícolas. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 13, n. 29, p. 146-161, 2017.

ASLAN, Irfan et al. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 2, p. 167-173, 2004.

ATHIE, Ivania; DALMO Cesar de Paula. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. São Paulo: Livraria Varela, 2. ed., 2002.

BALSAN, Rosane. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. **Revista de geografia agrária**, v. 1, n. 2, 2006.

BANDEIRA JR, Guerino et al. Potential uses of *Ocimum gratissimum* and *Hesperozygis ringens* essential oils in aquaculture. **Industrial crops and products**, v. 97, p. 484-491, 2017.

BARROS, Graça et al. Utilização de óleos essenciais na proteção de milho armazenado contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, p. 191-195, 2015.

BERNARDI, Daniel et al. **Bioecologia, monitoramento e controle do ácaro-rajado com o emprego da azadiractina e ácaros predadores na cultura do morangueiro**. Circular Técnica 83. Embrapa Uva e Vinho, 2010.

BOOTH, R. G.; COX, M. L.; MADGE, R. B. IIE. **Guides to insects of importance to man**. COLEOPTERA. London: C.A.B. International, 384 p., 1990.

BOTTON, M. et al. **O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado**. Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2005.

CAMPAGNOLLA, C.; BETTIOL, Wagner. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2003.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present or future?. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.

CHIASSEON, H.; BOSTANIAN, N.J.; VINCENT, C. Acaricidal properties of a Chenopodium-based botanical. **Journal of Economic Entomology**, v.97, p.1373-1377, 2004.

DE ARAÚJO, A. M. N. **Toxicidade, efeitos comportamentais e sinergismo de óleos essenciais**. Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE). RECIFE – PE, 2014.

DE BARROS, Alexandre Mendonça et al. A relevância da inovação tecnológica na agricultura brasileira. **Agroanalysis**, v. 38, n. 10, p. 27-29, 2019.

DE OLIVEIRA, Eugênio Eduardo et al. Seletividade de inseticidas a *Theocolax elegans* parasitóide de *Sitophilus zeamais*. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, 2002.

DE OLIVEIRA, Izabella Menezes. **Resistência de artrópodos de importância agrícola ao controle químico no Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, 2017.

DUKE, S. O. et al. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**, Gainesville, v. 50, n. 2, p. 138-151, 2002.

DUKE, S. O. et al. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. **Weed Research**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 99-111, 2000.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Revista Ambiência**, Guarapuava, v. 5, n. 2, p. 345 - 358, 2009.

FARMACOPÉIA, ANDVS. **Farmacopeia Brasileira**. Farmacopeia Brasileira, 5ª edição, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1> / Acesso em: 19 jan. 2020.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. University Printing House, Cambridge, 1952.

FRACARO, Fernando. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo in vitro de *Hesperozygis ringens* Benth.** Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2006.

FRACARO, Fernando; ECHEVERRIGARAY, Sergio. Genetic variability in *Hesperozygis ringens* Benth. (Lamiaceae), an endangered aromatic and medicinal plant of Southern Brazil. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 471-482, 2006.

GALLO, D. **Entomologia agrícola**. Biblioteca de ciências agrárias Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

GONÇALVES, Thamyres Sabrina. Interações ecológicas e evolutivas entre: Plantas, herbívoros e seus inimigos naturais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 3, p. 1-9, 2016.

Goni, M.L. et al. Supercritical CO₂ iof LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*). **J. Supercrit. Fluid** 122, 18–26, 2017.

HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente (ALICE). Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1059897/4/2016LV011.pdf>> Acesso em: 19 jan. 2019.

HAMMER, Øyvind et al. PAST: **Paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontologia electronica, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HERRERA, M.P. et al. Fumigant toxicity from five essential oil rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). **Agricoltura**, p. 35-41, 2014.

HINCAPIÉ, C.A.; LÓPEZ, G.E.; TORRES, R. Comparison and characterization of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs extracts and their effect on mortality and repellency of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.68, p.317-327, 2008.

HOY, M. A. Multitactic resistance management: an approach that is long overdue. **Florida Entomologist**, Gainesville, v.78, p. 443-451, 1995.

ISMANN, Murray B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, v. 19, n. 8-10, p. 603-608, 2000.

KAMANULA, John F. et al. Chemical variation and insecticidal activity of *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Industrial crops and products**, v. 110, p. 75-82, 2017.

LEE, S. et al. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, n. 1, p. 77-85, 2003.

LIAO, Min et al. Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. **Plos one**, v. 11, n. 12, p. e0167748, 2016.

LIMA, R. K. et al. **Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante**, 2013.

LORINI, I. et al., 2015. **Manejo Integrado de Pragas de Grãos e Sementes Armazenadas**. Embrapa, p. 81, Brasília, DF 2015.

MAJIKINA, Azusa et al. Involvement of nociceptive transient receptor potential channels in repellent action of pulegone. **Biochemical pharmacology**, v. 151, p. 89-95, 2018.

MARTINS, Rafael Castro. Óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. para controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797). Universidade Federal de Uberlândia (UFB), Uberlândia, MG, 2016.

MATIOLI, J.C., MATIOLI, C.H., ALMEIDA, A.A. Comportamento de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) quanto à localização dos orifícios de saída dos grãos de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, 1988.

MENEZES, E. L. A. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Embrapa Agrobiologia, p. 58, 2005.

MOORTHY, Bhagavatula et al. Madhava. Hepatotoxicity of pulegone in rats: Its effects on microsomal enzymes, *in vivo*. **Toxicology**, v. 55, n. 3, p. 327-337, 1989.

MORAES, G. D.; FLECHTMANN, C.W. **Manual de acarologia**. Acarologia básica e ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto, 2008.

MOREIRA, Márcio Dionízio et al. **Uso de inseticidas botânicos no controle de pragas. Controle alternativo de pragas e doenças**. EPAMIG/CTZM, p. 89-120, Viçosa, 2006.

MOUND, L. Common insect pests of stored food products. **Museum of Natural History. British**, p. 68, 1989.

OLIVEIRA, Hamilton et al. A phytoseiid predator from the tropics as potential biological control agent for the spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Biological Control**, v. 42, n. 2, p. 105-109, 2007.

OLIVEIRA, JE de M. et al. **Manejo da resistência do ácaro-rajado (*Tetranychus urticae* Koch) em videira no Submédio do Vale do São Francisco**. Embrapa Semiárido-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2016.

PACHECO, Luiz Fernando et al. Evaluation of acaricides in mite control *Tetranychus urticae* KOCH (Acari: Tertranychidae) physiophage of pepper *Capsicum annuum* L. **Revista científica Unisalesiano**, São Paulo, 2016.

PARK, Il-Kwon et al. Fumigant activity of plant essential oils and components from *Schizonepeta tenuifolia* against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). **Journal of economic entomology**, v. 99, n. 5, p. 1717-1721, 2006.

PEREIRA, Marcos Aurélio Almeida. **Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides* (St. Hil. ex Benth.) Epling**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2016.

PICANÇO, Marcelo Coutinho; GONRING, AHR; OLIVEIRA, IR de. **Manejo integrado de pragas**. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, p. 144, 2010.

PIMENTEL, Marco Aurélio Guerra et al. Resistência de insetos de produtos armazenados à fosfina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1671-1676, 2009.

PINHEIRO, Carlos Garrido. **Óleo essencial de *Hesperozygis ringens* (BENTH.) Epling: variabilidade do rendimento, composição química e atividades biológicas**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Santa Maria, RS, 2014.

PINHEIRO, C. G. et al. Seasonal variability of the essential oil of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling. **Brazilian Journal of Biology** 76, no. 1, 176-184, 2016.

PINHEIRO, Carlos G. et al. **Structural characterization of vegetative organs of the endangered Brazilian native species *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 3, p. 2887-2901, 2018.

POLETTI, M. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides to *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) and their impact on functional

response to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 30-36, 2007.

REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. **Integrated Pest Management Reviews**, v.2, p.25-34, 1997.

RIBEIRO, Vera Lucia Sardá et al. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2506-2509, 2010.

ROSA, I. A. et al. Extracts of *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling: in vitro and in vivo antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Journal of applied microbiology**, 2019.

SANTOS, J.P., MAIA, D.G., CRUZ, I. Efeito da infestação pelo gorgulho (*Sitophilus zeamais*) e traça (*Sitotroga cerealella*) sobre a germinação de sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 25, n. 12, 1990.

SCHLESENER, Daniele Cristine Hoffmann et al. Effects of neem on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and the predators *Phytoseiulus macropilis* (Banks) and *Neoseiulus Californicus* (Mcgregor)(Acari: phytoseiidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 59-66, 2013.

SILVA, A. de C. **Guia para o reconhecimento de inimigos naturais de pragas agrícolas**. Embrapa Agrobiologia-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2013.

SILVA F. R. et al. Exigências térmicas e tabela de vida de fertilidade de *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 291-296, 2005.

SILVA, D. T. et al. Larvicidal activity of Brazilian plant essential oils against Coenagrionidae larvae. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 4, p. 1713-1720, 2014a.

SILVA, G. L.; ROCHA, M.S. ; FERLA, N.J. . **Criação e aplicação de ácaros para controle biológico**. In: **Raul Antonio Sperotto. (Org.)**. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Lajeado: UNIVATES, 1 ed., p. 265-267, 2014b.

SOARES, Cristiana Silveira Antunes et al. Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta *desfolhadora Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae). **Revista Verde**, v. 6, p. 154-157, 2011.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática. **Guia ilustrado de identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., p 640, 2005.

TONG, Fan; COATS, Joel R. Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and 36Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 98, n. 3, p. 317-324, 2010.

TONI, Cândida et al. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 701-714, 2014.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography**. 1963.

VENZON, M.; Rosado, M.C.; MOLINA-RUGAMA, A.J.; DUARTE, V.S.; DIAS, R.; PALLINI, A. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae). **Crop Protection**, v.27, p. 869-872, 2008.

VERONEZ, Bruce; SATO, Mário Eidi; NICASTRO, Roberto Lomba. Toxicidade de compostos sintéticos e naturais sobre *Tetranychus urticae* e o predador *Phytoseiulus macropilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 511-518, 2012.

VITOUSEK, P. M.; NAYLOR, R.; CREWS, T.; DAVID, M. B. Nutrient Imbalances in Agricultural Development. **Science**, v. 324, n. 5934, p. 1519-1520, 2009.

VON POSER, Gilsane L. et al. Essential oil composition and allelopathic effect of the Brazilian Lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1829-1832, 1996.

ZHANG, Zhi-Qiang. **Mites of greenhouses: identification, biology and control**. Oxon: CABI, 2003.